



REG-14661397

VAUZGE

NLM -- W1 CH9817CEK (Gen)

US PATENT AND TRADEMARK OFFICE
SCIENTIFIC AND TECHNICAL INFO CTR
107 S. WEST STREET, PMB 803
ALEXANDRIA, VA 22314

ATTN: SUBMITTED: 2009-04-06 15:00:15
PHONE: 571-272-2517 PRINTED: 2009-04-07 10:30:32
FAX: 571-272-0230 REQUEST NO.: REG-14661397
E-MAIL: STIC-DOCS@uspto.gov SENT VIA: DOCLINE
DOCLINE NO.: 26854505

REG Copy Journal

TITLE: ZHONGGUO YI KE DA XUE XUE BAO = JOURNAL OF CHINA
MEDICAL UNIVERSITY
PUBLISHER/PLACE: Zhongguo yi ke da xue xue bao bian wei h
Shenyang Shi :
VOLUME/ISSUE/PAGES: 1997;26(5):449-452,462 449-452,462
DATE: 1997
AUTHOR OF ARTICLE: ha
TITLE OF ARTICLE: A LABORATORY STUDY ON ASTRAGALUS
ISSN: 0258-4646
OTHER NUMBERS/LETTERS: Unique ID.: 8802851
26854505
SOURCE: Unique Key
MAX COST: \$4.00
COPYRIGHT COMP.: Guidelines
CALL NUMBER: W1 CH9817CEK (Gen)

REQUESTER INFO: 682295
DELIVERY: E-mail Post to Web: STIC-DOCS@uspto.gov
REPLY: Mail:

KEEP THIS RECEIPT TO RECONCILE WITH BILLING STATEMENT
For problems or questions, contact NLM at http://wwwcf.nlm.nih.gov/ill/ill_web_form.cfm or phone 301-496-5511.
Include LIBID and request number.

NOTE: - THIS MATERIAL MAY BE PROTECTED BY COPYRIGHT LAW (TITLE 17, U.S. CODE)

黄芪合剂防治化疗性骨髓抑制的实验研究

哈敏文 李振 何安光

(肿瘤研究所化疗实验室, 沈阳 110001)

摘要 自拟黄芪合剂处方, 以荷 S_{180} 小鼠为观察对象, 探讨黄芪合剂对癌化疗药物骨髓抑制的影响。通过外周血象的 RPMI 变化, 淋巴细胞转化实验, 中性红染料摄入法检测巨噬细胞吞噬功能, 以及透射电镜对骨髓造血微环境超微结构进行观察。结果: 黄芪合剂对骨髓造血功能有保护作用, 外周白细胞及血小板计数与其它组对比有显著性差异 ($P < 0.01$); 黄芪合剂明显提升淋巴细胞转化率及巨噬细胞吞噬功能, ($P < 0.01$); 对巨噬细胞及网状内皮细胞等基质细胞有保护作用。

关键词 黄芪, 化疗, 骨髓抑制, 造血微环境

常用抗肿瘤药大多既能抑制和杀伤肿瘤细胞, 又能损害正常组织细胞, 特别是对造血细胞的损害, 从而影响治疗效果。中国传统医学的“扶正培本”治疗可以刺激骨髓的造血功能, 保护和提高机体免疫功能^[1]。本实验自拟黄芪合剂处方, 通过化疗中外周血象变化, 造血诱导微环境基质细胞透射电镜的形态学研究, 淋巴细胞转化率测定及巨噬细胞吞噬功能等实验, 观察中药黄芪合剂对癌化疗骨髓抑制的影响。

1 材料与方法

1.1 药品 黄芪合剂, 由黄芪、女贞子、当归等组成; 水煎剂, 每只小鼠 0.06 g/0.5 ml。

1.2 动物 昆明种纯系小鼠, 体重 19~21 g, 雌雄各半, 实验动物部提供; S_{180} 肉瘤细胞, 肿瘤所提供, 5~6 d 传代一次。于接种肉瘤 180(S_{180})后 7~11 d 内肿瘤生长旺盛期, 取出瘤块, 按 1:3 比例用无菌生理盐水稀释, 制成匀浆, 每鼠 0.2 ml 右腋皮下接种。24 h 后, 随机分组实验。

1.3 实验方法 将 48 只小鼠接种 24 h 后, 随机分成 4 组, 每组 12 只, 即荷瘤对照组(对照组)、荷瘤加化疗组(化疗组)、荷瘤加化疗加鲨肝醇组(鲨肝醇组)、荷瘤加化疗加黄芪合剂组(黄芪组)。

给药方法: 对照组生理盐水灌胃, 每日 0.5 ml, 连续 14 d; 化疗组生理盐水稀释的 5-Fu 浓度为 5 mg/ml, 每只小鼠腹腔注射, 实验第 1 天注射, 生理盐水灌胃, 每日 0.5 ml, 连续 14 天; 鲨肝醇组, 化疗药、剂量、给药途径及时间与化疗组相同, 鲨肝醇用蒸馏水溶解稀释, 每只小鼠 0.15 mg/0.5 ml, 每日灌胃, 连续 14 d; 黄芪组, 化疗药、剂量、给药途径及时间与化疗组相同, 黄芪合剂为水煎剂 0.5 ml, 每日灌胃, 连续 14 d。停药 24 h 后, 检测各项指标。

1.4 观察外周血象 白细胞总数、血小板计数。于实验第 4、7、11、14 天经尾静脉采血, 观察外周血象。

1.5 淋巴细胞转化实验(LTT) 心脏穿刺抽取 0.3 ml 新鲜血液, 注入 4 ml 含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液小瓶

中,加入适量植物血凝素(PHA),37℃,5%CO₂中湿度培养72 h,每天轻轻振摇一次。

取出后加蒸馏水4 ml破坏红细胞1 min,加4.5%盐水恢复等渗。500 r/min离心5 min去上清液,取细胞沉淀涂片,瑞氏染色,在显微镜下计数200个淋巴细胞,观察淋巴细胞转化情况,求出转化率。

1.6 巨噬细胞吞噬实验 用中性红染料摄入法检测。在无菌操作下,将小鼠肺脏取出,剪碎、研磨,尼龙网过滤。细胞匀浆以Hank's液洗涤2次。37℃,5%CO₂条件下

贴壁2 h。贴壁的细胞即为巨噬细胞,将贴壁细胞用Hank's液洗下,调整细胞数为1×10⁶/ml,将细胞悬液分注于96孔微量细胞培养板,每孔0.2 ml。37℃,5%CO₂条件下贴壁1 h,去上清,取出后用Hank's液洗涤细胞3次。然后每孔加入0.072%中性红(GIBCO)0.1 ml,孵育1 h。洗去细胞外的中性红。每孔加细胞溶解液(50%乙酸和50%无水乙醇)0.2 ml,待细胞溶解后,用EL-309自动酶标仪以570 nm波长检测光密度(OD值)。OD值反应相应的中性红

量,即为每孔细胞吞噬中性红的量,以反应巨噬细胞吞噬功能。

1.7 造血微环境细胞形态学观察 6例小鼠骨髓,其中对照组1例,化疗组2例,鲨肝醇组1例,黄芪组2例。经1%锇酸固定,丙酮脱水,环氧树脂600包埋,作70 nm超薄切片,醋酸铀和枸橼酸铅双重染色,在JOEL-1200EX透射电镜下观察网状内皮细胞及巨噬细胞的形态学变化。

1.8 统计学数据处理 本实验各项指标均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间t检验处理。

2 结果

2.1 黄芪合剂对外周血象的影响

对照组外周血象无明显变化。化疗药的骨髓毒副作用以实验第11天为重,而黄芪合剂于实验第11天、第14天表现出明显骨髓保护作用。黄芪组在WBC、PL指标中虽然低于对照组,但与化疗组、鲨肝醇组对比,均值有显著性差异(见表1)。

2.2 黄芪合剂对免疫功能的影响

2.2.1 淋巴细胞转化率:实验结果表明,

表1 黄芪合剂对血象影响($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 4 d | | 7 d | | 11 d | | 14 d | |
|------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | WBC (10 ⁹ /L) | PL (10 ⁹ /L) |
| 对照组 | 13.5±2.1* | 144±15** | 14.0±0.8** | 136±13** | 13.9±1.6** | 139±8** | 13.1±1.5* | 131±11* |
| 化疗组 | 3.4±1.0** | 65±9** | 2.9±1.5** | 55±12** | 2.1±0.2** | 53±10** | 4.0±1.0** | 56±10** |
| 鲨肝醇组 | 6.2±0.5 | 71±11 | 6.8±1.1 | 82±19 | 7.7±0.8** | 84±11** | 8.0±1.2** | 99±12* |
| 黄芪组 | 6.0±0.8 | 77±10 | 7.8±0.9 | 91±11 | 9.2±0.4 | 101±16 | 11.7±1.1 | 116±11 |

*P<0.01, **P<0.05, 与中药组比较

5-Fu对淋巴细胞转化率无明显影响,但与黄芪合剂合用时,可非常显著地增加淋巴细胞转化率,P<0.01。见表2。

表2 T淋巴细胞转化率($\bar{x} \pm s$, %)

| 对照组 | 化疗组 | 鲨肝醇组 | 黄芪组 |
|----------|----------|----------|-----------|
| 55.6±4.7 | 56.5±3.4 | 52.3±5.0 | 73.4±5.1* |

*P<0.01, 与中药组比较

2.2.2 巨噬细胞吞噬实验:5-Fu对巨噬

• 450 •

细胞吞噬功能无明显抑制,但黄芪组OD值比其它组显著升高,黄芪合剂有明显提高巨噬细胞吞噬中性红的能力。见表3。

表3 巨噬细胞吞噬能力($\bar{x} \pm s$)

| 指标 | 对照组 | 化疗组 | 鲨肝醇组 | 黄芪组 |
|-----|-------------|-------------|-------------|--------------|
| OD值 | 0.177±0.018 | 0.167±0.020 | 0.176±0.021 | 0.256±0.011* |

*P<0.01, 与中药组比较

2.3 骨髓的超巨大外形不规则。巨噬细胞才有凹痕。化疗组细胞破坏明显,改变十分严重,浆内见大量空泡,见图1~4。

中性红的量,以反应骨髓抑制的程度。形态学观察—6 例,1 例,化疗组 2 例,1 例,经 1% 铁酸固定 600 包埋,作 70 倍枸橼酸铅双重染色电镜下观察网状内皮细胞形态学变化。

本实验各项指标检验处理。

象的影响

明显变化。化疗药第 11 天为重,而黄第 14 天表现出明1 在 WBC、PL 指标化疔组、鲨肝醇组。见表 1。象的影响:实验结果表明,

| 14 d 前数据 | |
|-------------|-----------|
| WBC | PL |
| $10^9/L$ | $10^9/L$ |
| 3.1 ± 1.5* | 131 ± 11* |
| 0.0 ± 1.0** | 56 ± 10** |
| 0.0 ± 1.2** | 99 ± 12* |
| 11.7 ± 1.1 | 116 ± 11 |

制,但黄芪组 OD 增合剂有明显提能力。见表 3。

| 鲨肝醇组 | 黄芪组 |
|----------------|----------------|
| 0.176 ± 0.021* | 0.256 ± 0.011* |

2.3 骨髓的超微结构 网状内皮细胞为巨大外形不规则的扁平细胞,细胞核不规则。巨噬细胞不规则形,胞核呈椭圆形,常有凹痕。化疗组可见巨噬细胞及网状内皮细胞破坏明显,细胞急性损伤及坏死。膜的改变十分严重,质膜破坏,细胞器外溢,胞浆内见大量空泡形成,核固缩。黄芪组骨髓造血基质细胞病理改变明显轻于化疗组。见图 1~4。

3 讨论

黄芪合剂方解:根据“有形之血不能速生,无形之气必当急固”的治则^[2],黄芪为主药,温补气血,补气健脾以充生血之源;配黄芩滋补肝肾,养阴益精,扶正固本;当归补血养血;诸药配伍补气养血,添精益髓,使阴阳调平,气血方盛。

骨髓是人体最大的造血器官,造血干

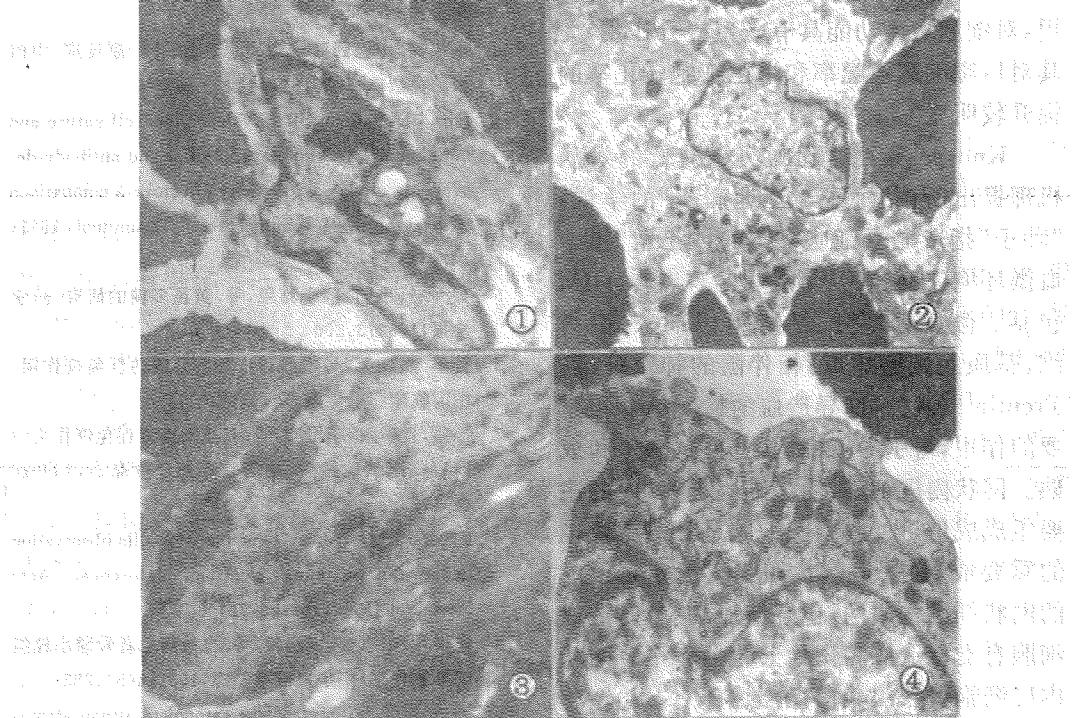


图 1 化疗组网状内皮细胞 $\times 8000$

图 3 黄芪组网状内皮细胞 $\times 12000$

图 2 化疗组巨噬细胞 $\times 6000$

图 4 黄芪组巨噬细胞 $\times 8000$

细胞是生成各种血细胞的原始细胞,又称多能干细胞,具有很强的增殖潜能。化疗药物是细胞毒剂,尤其对增殖活跃的骨髓造血组织作用强。黄芪合剂对化疗所致白细胞、血小板功能损害确实有明显的保护作用。黄芪组外周血象变化特点表明,该合剂在实验后期,作用更加明显。张仪钊^[3]认

为,癌化疔后的骨髓抑制主要表现为损伤气血、肝肾亏损等证候。黄芪合剂补气养血,滋补肝肾,健脾和胃的功效符合治则。

在机体的抗肿瘤免疫监视功能中,细胞免疫起主导作用,而 T 淋巴细胞是细胞免疫的核心^[4]。黄芪合剂能显著地增加淋巴细胞转化率和激活巨噬细胞并提高其吞

噬功能,提高机体的细胞免疫功能,为佐证该合剂扶正固本的功能提供依据。有报道从黄芪的水提液中分得多糖APS具有明显的免疫促进活性,其中AG-1、AH-1两种多糖经试验证明增强小鼠巨噬细胞吞噬功能^[5]。实验证明,从女贞子中提取的齐墩果酸具有促进淋巴细胞增殖和动物巨噬细胞吞噬功能^[6]。孙燕等^[7]研究认为,扶正培本是中医重要的治疗法则,在临床化疗过程中应用扶正中药,可以起到保护骨髓的作用,对细胞免疫功能具有一定提升作用,尤其对巨噬细胞吞噬率和淋巴细胞转化率的提升较明显。

Knospe等^[8]对造血功能减低的发病机理提出所谓“种子与土地病变”的学说。“种子”指造血干细胞(HSC),“土地”指造血微环境(HIM)。从形成学的观点看,HIM包括^[9]微血管部分;结缔组织部分,由纤维、基质及细胞组成;相伴随的神经纤维。Trentin^[10]认为,诱导造血的微环境有很重要的作用,可引导血细胞的分化、增殖和成熟。网状内皮细胞、巨噬细胞是HIM的主要组成成份。外膜网状细胞是骨髓微环境的重要成分之一,网状细胞突起和它形成的网状纤维构成网,包绕造血细胞,对造血细胞有支持造血和诱导分化的作用。网状内皮细胞可分泌集落刺激因子(CSF)。单核巨噬细胞是造血的主要调控细胞,通过直接和间接作用指挥各种辅助调控细胞对各系造血发挥调控效应。集落刺激因子是单核巨噬细胞分泌的造血调控因子,具有刺激骨髓造血的作用。透射电镜观察证明,

化疗药物明显损伤网状内皮细胞,细胞膜改变十分严重,而黄芪合剂对HIM的基质细胞有保护作用。Frederick认为,造血功能低下不单纯是HSC的病变,也与HIM的病变有关。本实验结果验证了这一论点。

参 考 文 献

- 1 张仪钊.中医药防治癌症病人放化疗副反应的进展(综述).癌症,1985;4(4):240
- 2 孙隆生,朱新勇,于秋华,等.癌血生合剂纠正肿瘤放化疗骨髓抑制100例分析.肿瘤防治研究,1994;21(3):190
- 3 张仪钊.中医药防治癌症患者放、化疗副反应.中西医结合杂志,1988;8:144
- 4 Fast LD, Palma SR. Evidence for T cell nature and heterogeneity within natural killer and antibody-dependent cellular cytotoxicity effectors: a comparison with cytolytic T lymphocytes. J Immunol, 1981;127:448
- 5 黄乔书,吕归宝,李雅臣,等.黄芪多糖的研究.药学学报,1982;3:200
- 6 孙燕,袁瑞荣,吴道居,等.齐墩果酸的促免疫作用.中国临床药理学杂志,1988;4(1):26
- 7 孙燕,袁瑞荣,李维廉,等.扶正女贞素促免疫作用的双盲临床试验结果.中国临床药理学杂志,1990;6(2):72
- 8 Knospe LM. Human bone marrow cells observation under the scanning electron microscope. Acta Haematol JPN, 1982;45:721
- 9 杨崇礼,张志宏,卞小薇,等.血液病患者骨髓小粒组织学的观察.中华血液学杂志,1981;2(5):288
- 10 Trentin JJ. Influence of hematopoietic organ stroma on stem cell differentiation in regulation of hematopoiesis. N Engl J Med, 1970;1:161

(1996-07-09 收稿)

(下转第462页)

The Effects of Lead on PKC Activity in Long Term Potentiation at Hippocampal Zones of Rats

Xing wei, Sun Liguan, Liu Suyuan

(Department of Biochemistry, School of Basic Medical Sciences, China Medical University, Shenyang, 110001)

In order to observed the effects of lead on PKC activity in long term potentiation (LTP) at hippocampal zones of rats. We induced LTP from hippocampal zones with high frequency stimulation (HFS) and measured PKC activity after feeding the rats with 0.1% lead acetate for three months. Results: PKC activity of cytosol and membrane increased greatly compared with control group ($P < 0.001$). Discussion: PKC plays an important role in the process of lead interfering with LTP.

Key words PKC; hippocampal zones; Lead; LTP

(上接第 452)

A Laboratory Study on *Astragalus Membranaceus* Mistura in the Prophylaxis and Treatment of Myelosuppression Caused by Cancer Chemotherapy

Ha Minwen, Li Zhen, He Anguang

(Cancer Institute, China Medical University, Shenyang, 110001)

The purpose of this study was to evaluate the effect of *Astragalus membranaceus* mistura on the chemotherapy-associated toxicity. *Astragalus membranaceus* mistura was used in combination with four traditional Chinese medicine herbs: *astragalus membranaceus*, *ligustrum lucidum*, *angelica sinensis*, and *glycyrrhiza uralensis*. 48 "S₁₆₀" mice were randomly assigned to four groups: group I, control group; group II, 5-Fu alone; group III, 5-Fu combined with Batirole; group IV, 5-Fu combined with *Astragalus membranaceus* mistura. We determined the changes by peripheral blood indices. The percentage of lymphocyte transformation was detected by lymphocyte transformation test. Macrophage phagocytosis was detected with Neutral Red Dye Uptake method. hemopoietic microenvironment for bone marrow was studied under TEM. The incidence of toxication caused by chemotherapy, leukocytopenia and thrombocytopenia were observed. The results: the leukocyte and platelet counts were much more in group IV than in other groups ($P < 0.01$); the macrophage phagocytotic ability and lymphocyte transformation percentage were significantly higher in group IV in other groups ($P < 0.01$). Conclusion: *Astragalus membranaceus* mistura could overcome the toxicity of cancer chemotherapy in hematopoietic system. This therapy was effective in modulating myelosuppression induced by chemotherapy. *Astragalus membranaceus* mistura was effective for the enhancement of cellular immune response, and was able to improve the function of both lymphocytes and macrophages. *Astragalus membranaceus* mistura could protect reticulocyte and monocyte-macrophage from impairment caused by chemotherapy.

Key words *astragalus membranaceus*; chemotherapy; myelosuppression; immune-modulating effect; hemopoietic microenvironment